Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 103- 115

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1399، ص. 115-103

اثرات هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بر برخی خصوصیات کیفی و پایداری اکسایشی روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده

سید حسن جلیلی[1]- رضا فرهوش[2*]- آرش کوچکی[2]- عباسعلی مطلبی[3]

تاریخ دریافت: 1397/03/08
تاریخ پذیرش: 1397/10/25

چکیده

اثرات غلظت‌های 1 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای بر برخی خصوصیات کیفی و پایداری اکسایشی روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده شیمیایی (Hi-Cap® 100) در دو pH 6/8 و 3/4 طی 28 روز نگهداری در دمای 45 درجه سلسیوس در تاریکی، مقایسه گردیده است. روغن ماهی با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چند لایه (آلومینا- سیلیکاژل) پالایش و ترکیب اسیدهای چرب آن تعیین گردید. در تصاویر میکروسکوپ نوری به‌هم‌پیوستن قطرات و ایجاد خوشه در میکروامولسیون‌ها مشاهده نشد. اثرات pH بر میانگین اندازه قطرات و کارآیی ریزپوشانی قابل ملاحظه نبود ($p>0.05$) ولی بر میزان روغن آزاد و پایداری امولسیون در غلظت‌های بیشتر و مساوی 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معنی‌دار بود ($p<0.05$). پپتیدهای موجود در هیدرولیز به‌طور مؤثری سرعت اکسایش روغن کیلکا را در سامانه مدل را کند نمودند. روند توسعه اکسیداسیون اولیه، وابسته به غلظت محلول هیدرولیزی و برای تیمار شاهد و تیمارهای 1 تا 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت غیرخطی بود. این روند برای تیمار 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت خطی، با شیب ملایم، و در pHهای مختلف به‌طور مشابه، تا روز 28 ادامه داشت. یافته‌های تحقیق زمینه استفاده از هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی برای تولید میکروامولسیون‌های ریزپوشانی شده پایدار روغن ماهی، جهت غنی‌سازی انواع غذاها با دامنه گسترده pH را فراهم می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: روغن ماهی کیلکا، هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای، آلکالاز، ریزپوشانی، پایداری اکسایشی.

مقدمه

افزایش روزافزون تقاضای جهانی برای غذاهای مغذی و فراسودمند، محققین صنعت غذا را برآن داشته که فعالیت‌های تحقیقاتی خویش را در همین راستا متمرکز نمایند. روغن ماهی، به‌ویژه ماهیان پشت آبی دریایی مانند ساردین و کیلکا، غنی‌ترین و مناسب‌ترین منبع اسیدهای چرب چندغیراشباع بلند زنجیر اُمگا-3 می‌باشد. این اسیدهای چرب شامل اسید آلفا لینولنیک (ALA C18:3)، و متابولیت‌های زنجیره بلندتر آن شامل اسیدهای ایکوزاپنتانوئیک (EPA C20:5) و دوکوزاهگزانوئیک (DHA C22:6) هستند که به‌طور اختصاصی در آبزیان یافت می‌شوند (Kolanowski *et al*., 2006). اسیدهای چرب اُمگا-3 نه تنها برای بدن ضروری هستند بلکه اثرات سلامت‌بخش و درمانی آن‌ها، به‌ویژه در پیشگیری بیماری‌های قلبی– عروقی و بهبود عملکرد سامانه اعصاب مرکزی، طی تحقیقات زیادی به اثبات رسیده است (GOED, 2018). وجود مقادیر قابل ملاحظه اسیدهای چرب ضروری منحصربفرد در روغن ماهی این امکان را فراهم می‌سازد که از آن در تولید غذاهای فراسودمند، به‌منظور تأمین نیازهای تغذیه‌ای و در عین حال اثرات سودمند بر سلامت مصرف‌کنندگان، استفاده نمود (Kolanowski *et al*., 2006). چالش اصلی در به‌کارگیری روغن ماهی جهت مصرف مستقیم و یا تولید غذاهای فراسودمند، ناپایداری بسیار بالای اسیدهای چرب چندغیراشباع بلند زنجیر آن در برابر فساد اکسایشی و تولید ترکیبات مضر دارای بو و طعم نامطلوب می‌باشد. بنابراین نیاز ضروری به حفظ کیفیت و پایدارسازی این محصول ارزشمند حین فرآیند، حمل‌ونقل و نگهداری وجود دارد (Carneiro *et al*., 2012). در حال حاضر برخی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نظیر بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلیتد هیدروکسی آتیزول (BHA) و ترت– بوتیل هیدروکوئینون (TBHQ) به‌عنوان مهارکننده

1 و 2- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استاد، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
3- استاد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، تهران.
(* - نویسنده مسئول: Email: rfarhoosh@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v15i2.73120

رادیکال‌های آزاد در سامانه‌های بیولوژیک و غذایی به‌کار می‌روند، اما استفاده از این نوع ترکیبات، به دلیل تهدیدات سلامت مصرف‌کنندگان با محدودیت‌ها و مشکلات جدی مواجه شده است (Cai *et al*., 2015). یافتن جایگزین‌های طبیعی جدید با فعالیت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب، نه یک انتخاب خوب، بلکه گزینه‌ای اجتناب‌ناپذیر خواهد بود.

ماهی کپور نقره‌ای با نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* به‌طور گسترده در مناطق مختلف ایران پرورش داده می‌شود و بیش از 50 درصد ماهیان گرمابی پرورشی کشور (بیش از صد هزار تن/ سال) را تشکیل می‌دهد (سامانه سازمان شیلات ایران، 1397). در دهه اخیر با احداث کارخانجات جدید، با استفاده از دستگاه‌های استخوان‌گیر بخشی از این ماهیان به گوشت چرخ‌شده[1] و فرآورده‌های فرموله آماده طبخ نظیر ناگت تبدیل می‌گردند. توسعه صنایع فرآوری، تولید فرآورده‌های جانبی را به‌دنبال داشته که بخش قابل ملاحظه‌ای از اندام‌های آبزیان را شامل می‌شود. عدم استفاده و یا استفاده ناکارآمد این مواد، علاوه بر هدررفت سرمایه‌ها و منابع غنی تغذیه‌ای و فراسودمند، مشکلات زیست‌محیطی و بهداشتی را نیز در پی دارد. پوست آبزیان و از جمله کپور نقره‌ای، منبع غنی از پروتئین‌های ارزشمند بافت همبند می‌باشد که به‌عنوان پسماند فرآوری و با بهایی بسیار ارزان در دسترس است. مجموع پوست و استخوان باقیمانده پس از گوشتگیری با دستگاه استخوانگیر[2] برای ماهی‌های کپور نقره‌ای با میانگین وزن یک کیلوگرم، حدود 10 درصد می‌باشد. پوست شستشو و تمیز شده حدود 3/5 درصد از وزن کل لاشه را شامل می‌شود (اطلاعات منتشر نشده شخصی). بدین ترتیب سالیانه مقدار قابل توجهی از پوست این ماهی دور ریز شده و یا همراه سایر فرآورده‌های جانبی، صرف تولید آرد ماهی می‌گردد.

هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های موجود در پسماندهای فرآوری و فرآورده‌های جانبی، در صنایع غذایی برای تولید مواد با خواص عملکردی تقویت‌شده به‌کار گرفته می‌شود (Valencia *et al*., 2014). هیدرولیزهای پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال با 2 تا 20 اسیدآمینه هستند که به دلیل اثرات مثبت بر سلامت و عملکردهای بسیار متنوع و از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مورد توجه روز افزون قرارگرفته‌اند (Chi *et al*., 2015). ترکیب و توالی اسیدهای آمینه، تعیین‌کننده خواص عملکردی پپتیدها می‌باشد که به منشاء پروتئین، روش و شرایط آماده‌سازی، فرآوری و توزیع وزن مولکولی هیدرولیزهای حاصل بستگی دارد (Gómez-Guillén *et al*., 2011). فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی برای هیدرولیزهای پروتئینی مختلف با منشاء آبزیان، شامل پوست ماهی هوکی (Mendis *et al*., 2005)، پوست ماهی تون (Gómez-Guillén *et al*., 2010). پوست تیلاپیا (Zhang et al., 2012)، پسماندهای فرآوری کپور نقره‌ای (Zhong *et al*., 2011)، تخم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Chalamaiah *et al*., 2015)، پوست آلاسکا پولاک (*Theragra chalcogramma*) (Li *et al*., 2017)، کولاژن پوست کپور نقره‌ای (Zhang *et al*., 2017) و پوست کپور علفخوار (Cai *et al*., 2015 Yi *et al*., 2017 and) گزارش شده است. نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز آنزیمی شامل نسبت آنزیم/ سوبسترا، نسبت ماده/ حلال، دما، زمان و pH می‌توانند بر طول زنجیره پپتیدها و خواص عملکردی هیدرولیزهای پروتئینی موثر باشند (Chi *et al*., 2014). اختصاصی بودن پروتئازهای مورد استفاده برای هیدرولیز می‌تواند تعیین‌کننده اندازه و توالی پپتیدها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها باشد. آلکالاز به دلیل اندوپپتیداز بودن با طیف گسترده خصوصیات، پایداری در برابر تغییرات pH، و قیمت نسبتاً پائین، کاندید مناسبی برای تولید صنعتی هیدرولیزهای پروتئینی معرفی شده است (Doucet *et al*., 2003). در مطالعات متعددی از آلکالاز به‌عنوان بهترین پروتئاز برای آزادسازی پپتیدهای با قابلیت بازدارندگی اکسایش روغن‌ها در سامانه‌های مختلف، یاد شده است (Mendis *et al*., 2005، Alemán *et al*., 2011، Dong *et al*., 2008، Yi *et al*., 2017 and Chi *et al*., 2015).

مکانیزم‌های اکسایش لیپیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در سامانه‌های چندفازی (ناهمگون) مواد غذایی، بسیار پیچیده است و عوامل مختلفی می‌توانند بر سرعت و میزان اکسیداسیون و تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در اینگونه سامانه‌ها اثرگذار باشند. به دلیل چنین پیچیدگی‌هایی پیش بینی رفتار و کارآیی آنتی‌اکسیدان‌ها در سامانه‌های مختلف مواد غذایی امری دشوار می‌باشد و از این‌رو انتخاب آنتی‌اکسیدان مناسب و کارآمد، اغلب با آزمون و خطا صورت می‌گیرد (Jacobsen *et al*., 2008). به‌منظور ارزیابی صحیح و دقیق توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در مواد غذایی بایستی از مدل‌هایی استفاده گردد که از حیث شیمیایی، فیزیکی و شرایط محیطی مشابه محصولات غذایی مورد نظر باشند. در تحقیق حاضر اثرات پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای با آنزیم آلکالاز، بر پایداری اکسایشی روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده در سامانه مدل با pHهای 6/8 و 3/4 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

آنزیم آلکالاز از باکتری *Bacillus licheniformis* (2.4 L) و مالتودکسترین (DE= 4.0-7.0)، از شرکت سیگما (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)، سیلیکا ژل (grade 60, 230-400 mesh, 60 A°)، آلومینا (Aluminum oxide 60) و اسید سیتریک خوراکی از شرکت Merck کشور آلمان خریداری گردیدند. نشاسته اصلاح‌شده شیمیایی مشتق‌شده از ذرت مومی (n-octenyl

---

1 Minced

2 Deboner

succinic anhydride یا OSAN) (Hi-Cap® 100) با حداکثر رطوبت 5 درصد از شرکت National Starch انگلستان تهیه گردید. سایر مواد و محلول‌های مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی بودند.

ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) تازه صید شده، با اوزان 1295- 930 گرم از بازار ماهی شهرستان رشت، استان گیلان خریداری گردید. ماهی‌ها به‌صورت یخ‌گذاری‌شده در یخدان عایق منتقل گردید. ابتدا فلس و سپس پوست هر ماهی به‌صورت دستی جدا شد. پوست‌ها با آب قابل شرب خنک و با استفاده از بُرس تا جداسازی کامل گوشت‌های باقی مانده، شستشو و تمیزگردیدند. سپس به قطعات حدود 5 سانتی متر برش داده شده و تا زمان پیش‌تیمار در فریزر (18- درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

پیش‌تیمار پوست

پوست ماهی کپور نقره‌ای قبل از هیدرولیز با روش عمل شده توسط Ketnawa و همکاران (2017) با اندکی اصلاح، پیش‌تیمار گردید. خیساندن اولیه با استفاده از NaOH (0/1 مولار) با نسبت پوست به قلیا 1 به 8، در دمای4±1 درجه سلسیوس، به مدت سه ساعت انجام شد. هر 10 دقیقه محلول به صورت ملایم همزده شد. سپس پوست قلیایی شده با آب شرب جاری چندین مرتبه آبکشی، تا pH آب به کمتر از 7/5 برسد. پس از آن خیساندن در اسید استیک (0/1 مولار) با نسبت اسید به پوست 1 به 8 در دمای محیط به مدت 2 ساعت انجام شد. پوست تیمارشده با اسید تا خنثی شدن آب خروجی، کاملاً شستشو گردید. پوست شفاف‌شده متورم، در خشک‌کن انجمادی (OPERON, OPR-FDB-5503, Korea) تا رطوبت کمتر از 10 درصد خشک، پس از بسته‌بندی در کیسه‌های نایلونی با دوخت حرارتی، تا انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری گردید.

هیدرولیز آنزیمی پوست

هیدرولیز آنزیمی پوست کپور نقره‌ای با اندکی اصلاحات، طبق روش گزارش شده توسط قنبری و همکاران (2015) انجام شد. پوست پیش‌تیمار شده در آب مقطر با نسبت وزنی 1 به 20 (وزنی/ حجمی) در طول شب و در یخچال خیسانده شد. سپس توسط همزن دستی تیغه‌ای (گوشت‌کوب برقی، Philips) کاملاً همگن گردید. pH محلول با چند قطره هیدروکسید سدیم (0/1 نرمال) حدود 7/0 تنظیم، دمای آن به 50 درجه سلسیوس رسانده شد. پروتئولیز با آنزیم آلکالاز (1%) به مدت 4 ساعت با همزدن ملایم و پیوسته صورت گرفت. پس از این مدت، با قرار دادن نمونه در حمام آب‌جوش به مدت 15 دقیقه، آنزیم غیرفعال و واکنش هیدرولیز متوقف گردید. پس از سانتریفوژ نمودن در 13000 g برای 20 دقیقه، مایع شفاف (حاوی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز) جمع‌آوری و در خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید. پودر حاصل پس از بسته‌بندی در کیسه‌های نایلونی تا زمان تهیه میکروامولسیون‌ها در فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری ترکیبات تقریبی و pH

میزان رطوبت نمونه‌ها به روش قرار دادن در دمای 105 درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت، تعیین گردید. مقدار خاکستر با سوزندان نمونه‌ها در کوره الکتریکی با دمای550 درجه سلسیوس تا دستیابی به خاکستر سفید رنگ، محاسبه گردید. میزان پروتئین خام (N × 6.25) نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هضم‌وتقطیر (Behr, S4, Germany) به روش میکروکجلدال به‌دست آمد. مقدار روغن نمونه‌ها نیز به روش وزن‌سنجی، با استخراج روغن نمونه در دستگاه سوکسله با حلال پترولئوم‌اتر تعیین گردید (AOAC, 2000). اندازه‌گیری pH به‌صورت مستقیم درون محلول با استفاده از دستگاه pHمتر (WTW, pH 7110, Germany) انجام شد.

پالایش روغن ماهی کیلکا

جهت پالایش و حذف ناخالصی‌های روغن، از کروماتوگرافی ستونی چندلایه (آلومینا- سیلیکاژل)، طبق روش و شرایط گزارش شده توسط پژوهان‌مهر (1395)، با اصلاحات جزئی، استفاده گردید. برای این منظور ابتدا آلومینا و سیلیکاژل به مدت 3 ساعت به‌ترتیب در دماهای 200 و 160 درجه سلسیوس فعال شدند. انتهای ستون شیشه‌ای کروماتوگرافی با قطر داخلی 3 سانتی‌متر و طول 60 سانتی‌متر به ارلن بوخنر متصل به پمپ خلأ وصل شد. پس از پر کردن یکنواخت ستون به‌ترتیب با 60 گرم آلومینا و 80 گرم سیلیکاژل، 100 گرم روغن خام ماهی کیلکا از ستون عبور داده شد. بالای ستون بادکنک حاوی گاز ازت متصل گردید و اطراف آن و همچنین ارلن بوخنر با ورقه آلومینیومی پوشانیده شد. با قرار دادن ارلن در ظرف حاوی یخ خرد شده، روغن حین استحصال تا دمای ذوب یخ خنک گردید. روغن خروجی از ستون، بلافاصله درون لوله‌های درپوش‌دار، با دمش گاز ازت بسته‌بندی و در تاریکی و دمای 18- درجه سلسیوس نگهداری گردید. ساختار شیمیایی و اسید چربی روغن تخلیص‌شده ماهی کیلکا در جدول 1 نشان داده شده است.

تعیین ترکیب اسیدهای چرب روغن

ترکیب اسید چربی نمونه‌های روغن کیلکا به‌وسیله کروماتوگرافی گازی تعیین و براساس درصد نسبی گزارش شد. استرهای متیل اسیدهای چرب با اختلاط روغن و هگزان (0/3 گرم در 7 میلی‌لیتر) با 7 میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی دو نرمال در دمای50 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه تهیه شدند. استر اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه HP-5890 (Hewlett-Packard, SC,USA) مجهز به ستون‌های مویینه CP- FIL88 شیشه‌ای سیلیکا،60 متر طول در 0/22

میلی‌متر قطر داخلی، 0/2 میکرومتر ضخامت فیلم و شناساگر یونی شعله‌ای شناسایی شد. گاز نیتروژن به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان 0/75 میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. آون در دمای 198 درجه سلسیوس، تزریق‌کننده و شناساگر در دمای 250 درجه سلسیوس حفظ شد (Farhoosh *et al.*, 2008).

جدول 1- ترکیب اسیدهای چرب روغن تخلیص شده کیلکای دریای خزر با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چند لایه‌ای (آلومینا- سیلیکاژل)

اسید چرب	روغن تخلیص شده ماهی کیلکا
میریستیک، C14:0	6/35 ± 0/09
پالمیتیک، C16:0	17/16 ± 0/21
پالمیتولئیک، C16:1 ω-7	12/47 ± 0/14
مارگاریک، C17:0	1/54 ± 0/07
استئاریک، C18:0	3/07 ± 0/03
اولئیک، C18:1 ω-9	25/56 ± 0/35
لینولئیک، C18:2 ω-6	7/61 ± 0/09
آلفا لینولنیک، C18:3 ω-3	1/29 ± 0/04
آراشیدیک، C20:0	1/11 ± 0/03
آراشیدونیک، C20:4 ω-6	0/25 ± 0/02
ایکوزاپنتانوئیک (EPA)، C20:5 ω-3	9/83 ± 0/41
دوکوزاهگزانوئیک (DHA)، C22:6 ω-3	7/96 ± 0/15
سایر اسیدهای چرب	5/80

(1)میانگین ± انحراف معیار (سه تکرار)

روش ریزپوشانی و تهیه تیمارهای مورد بررسی

براساس روش گزارش شده توسط Carneiro و همکاران (2012) با بخشی اصلاحات، امولسیون با 31/25 درصد ماده خشک تهیه گردید. 25 درصد مواد دیواره‌ای (نسبت‌های مساوی مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده)، روغن ماهی 25 درصد مواد دیواره‌ای و هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای (جهت تهیه تیمارهای 1، 2، 3، 4 و 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روغن ماهی) مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا بافرها با دو pH تنظیم‌شده 6/8 و 3/4 به‌عنوان فاز آبی، تهیه گردید. تهیه بافرها با استفاده از اسید سیتریک (0/1 مولار) و دی‌سدیم‌فسفات (0/2 مولار) طبق روش عمل شده توسط طاهریان و همکاران (2011) انجام شد. تنظیم pH نهایی با استفاده از اسید کلریدرک و هیدروکسید سدیم 0/1 نرمال صورت گرفت. نسبت‌های تعیین‌شده مواد دیواره‌ای و هیدرولیز پروتئینی، به همراه سدیم آزید به میزان 0/02 درصد، توزین و به آهستگی به حجم معین بافر (25 درجه سلسیوس) در حال همزدن، اضافه شده و به مدت 20 دقیقه توسط مگنت، همگن گردید. پس از آن به بطری‌های درپوش‌دار منتقل و جهت جذب کامل آب در طول شب، در یخچال قرار داده شد. روز بعد، پس از هم‌دمایی با محیط و هموژن‌سازی مجدد فاز آبی، نسبت تعیین شده روغن پالایش شده کیلکا به آرامی و حین همزدن به آن‌ها افزوده گردید. امولسیون اولیه ابتدا با استفاده از اولتراتوراکس (T25 digital ،IKA، آمریکا) با 15000 دور در دقیقه به مدت 2 دقیقه و سپس توسط هموژنایزر پیستونی مدار بسته (HSTO، KL1,2، آلمان)، تحت فشار 350 بار و 5 نوبت عبور، به میکروامولسیون تبدیل گردید. نمونه‌ها درون بطری‌های تیره درپوش‌دار استریل بسته‌بندی گردید.

اندازه‌گیری روغن سطحی، تعیین کارآیی ریزپوشانی و روغن آزاد

مقدار 50 میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده را به 75 میلی‌لیتر حلال هگزان اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق با دور کند همزده تا روغن سطحی استخراج شود. مخلوط درون قیف جداکننده ریخته شده و لایه فوقانی (حلال) جدا گردید. حلال جدا شده را به کمک تبخیرکننده دوار متصل به خلاء تبخیر نموده، با توزین روغن باقی‌مانده در ظرف، روغن سطحی تعیین شد. میزان کارایی ریزپوشانی (MEE[1]) با استفاده از معادله (1) محاسبه گردید:

MEE (%)= (روغن کل-روغن سطحی)/ روغن کل × 100 (1)

1 Microencapsulation Efficiency

که در آن مقدار روغن کل از وزن روغن اولیه اضافه شده به امولسیون محاسبه شده است.

برای محاسبه درصد روغن آزاد از معادله (2) استفاده شد:

(2) 100 ×روغن کل /روغن سطحی=روغن آزاد (٪)

پایداری امولسیون

پایداری امولسیون با اندکی اصلاحات، طبق روش گزارش شده توسط Carneiro و همکاران (2012) با آزمایش تشکیل خامه محاسبه گردید. بلافاصله پس از تهیه امولسیون، مقدار 25 میلی‌لیتر از هر نمونه درون لوله‌های مدرج درپوش‌دار ریخته شد. پس از دربندی به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. حجم فاز فوقانی جدا شده محاسبه و درصد جداشدن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{جدا شدن (\%)} = (H_1/H_0) \times 100 \qquad (3)$$

که در آن H_0 بیانگر حجم اولیه امولسیون و H_1 نشان‌دهنده فاز فوقانی جدا شده می‌باشد.

اندازه قطرات امولسیون

میانگین اندازه قطرات میکروامولسیون با استفاده از دستگاه پراکنش نور لیزر Mastersizer (Malvern Instruments, UK)، در دمای آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. مقدار کمی از هر نمونه با آب رقیق و با مگنت همزده شد. تعیین توزیع اندازه قطرات در هر آزمایش تا ثابت شدن و قرائت کامل ادامه یافت. اندازه قطرات برحسب D_{32} میانگین قطر ساتر بیان گردیده است (Klaypradit *et al*., 2008).

ساختار میکروسکوپی امولسیون‌ها

میکروسکوپ نوری (LABOMED، LX400، امریکا) متصل به کامپیوتر با برنامه Turbo scan (TSView) از شرکت TSDT مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده با عدسی 40× و پس از 24 ساعت صورت گرفت. رقیق‌سازی نمونه‌ها جهت مشاهده میکروسکوپی با سدیم دو دسیل سولفات 0/1 درصد نسبت 1 به 10 انجام شد (Koocheki *et al*., 2009).

ارزیابی پایداری اکسایشی سامانه روغن ماهی ریزپوشانی شده

اثر محافظت‌کنندگی غلظت‌های 1 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای بر پایداری اکسایشی روغن ریزپوشانی شده کیلکا در محلول‌های اسید سیتریک نمکی با pH 3/4 (مشابه غذاهای اسیدی مانند آبمیوه‌ها) و بافر فسفات نمکی با pH 6/8 (مشابه فرآورده‌های با pH خنثی نظیر شیر) (Taherian *et al*., 2011) در دمای 45^{oC} در تاریکی (Carneiro *et al*., 2012) مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین پایداری اکسایشی در سامانه مدل بلافاصله پس از تولید و پس از آن هر چهار روز به مدت 4 هفته، با استفاده از روش فریک‌سیانید، طبق روش گزارش شده توسط Chi و همکاران (2015) انجام شد. به‌طور خلاصه مقدار 0/1 میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده با 4/7 میلی‌لیتر اتانول (75 درصد)، 0/1 میلی‌لیتر تیوسیانات‌آمونیوم (30 درصد)، و 0/1 میلی‌لیتر کلریدفروس (0/02 مولار) در اسید کلریدریک 3/5 درصد، مخلوط گردید. پس از 3 دقیقه، مقدار جذب بر اثر شدت رنگ ایجاد شده، که بیانگر میزان اکسیداسیون اولیه روغن می‌باشد، در طول موج 500 نانومتر قرائت و گزارش شده است.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از برنامه کامپیوتری SPSS 17.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. داده‌ها براساس میانگین± انحراف معیار (n=3) گزارش شده است. برای مقایسه تفاوت بین میانگین داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، پس‌آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) در سطح معنی‌دار بودن $p \leq 0/05$ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات تقریبی پوست

تیمار با هیدروکسید سدیم و اسید استیک علاوه بر بی‌رنگ کردن و شفاف‌سازی، موجب جذب آب و تورم پوست گردید. میزان رطوبت پوست پس از تیمار از 76/20 به 85/63 به میزان حدود 12/4 درصد افزایش یافت (جدول 2). به تناسب افزایش رطوبت، هریک از سایر ترکیبات موجود در ماده خشک پوست شامل پروتئین، لیپید و خاکستر نیز کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p<0.05$). نتایج اثرات تیمار اولیه بر تغییرات ترکیبات تقریبی پوست در این تحقیق مشابه نتایج گزارش شده توسط Alemán و همکاران (2011) در خصوص کاهش قابل ملاحظه میزان چربی و Zhang و همکاران (2017) در خصوص جذب آب و تورم پوست، می‌باشد. می‌توان ادعا نمود که روش و شرایط پیش‌تیمار به‌کار رفته، مقادیر روغن و خاکستر را تا سطح قابل قبول کاهش داد.

ساختار میکروسکوپی امولسیون‌ها

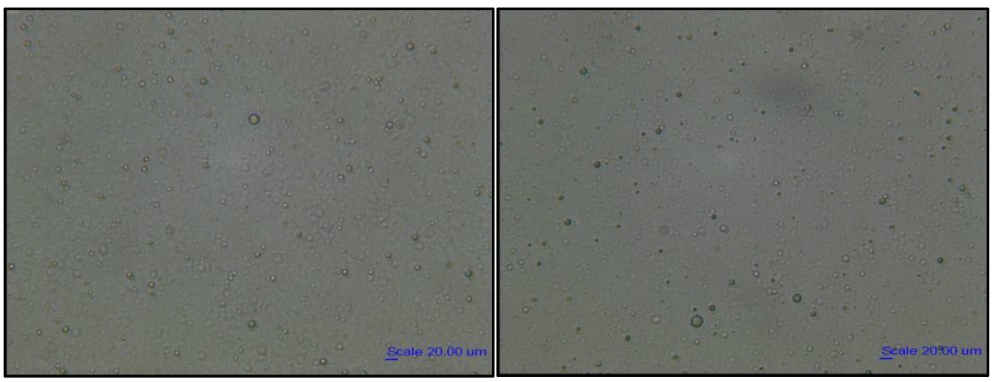
شواهدی از تجمع/ بهم‌پیوستن و ایجاد خوشه پس از گذشت 24 ساعت نگهداری در یخچال در میکروامولسیون‌های حاوی روغن کیلکای ریزپوشانی شده در دو pH 3/4 و 6/8 مشاهده نشد (شکل 1). مالتودکسترین و نشاسته اصلاح شده به صورت همگن توزیع گردیده، روغن ماهی را پوشش دادند. براساس مشاهده خصوصیات مرفولوژیک

میکروامولسیون‌ها می‌توان ادعا نمود که در صورت عدم استفاده از کمپلکس کربوهیدرات- پپتید و تنها با استفاده از مواد دیواره‌ای به‌کار رفته می‌توان ریزپوشانی مناسب روغن کیلکا را با استفاده از فرآیند همگن‌سازی مناسب انجام داد. مشاهدات با میکروسکوپ نوری نشان داد که جمعیت کوچکی از قطرات بزرگتر پس از همگن‌سازی، در امولسیون‌ها وجود دارند. حضور قطرات بزرگ در امولسیون می‌تواند موجب کاهش پایداری گردد (Surh *et al.*, 2006). مشاهده اخیر منطبق و تأیید کننده یافته‌های حاصل از اندازه قطرات و نسبت جدا شدن امولسیون (جدول 3) می‌باشد

جدول 2- ترکیبات تقریبی پوست کپور نقره‌ای قبل و پس از تیمار با هیدروکسید سدیم و اسید استیک *(g/100g)

شاخص	پوست اولیه	پوست پیش تیمار شده
رطوبت	76/20ᵃ± 0/54	85/63ᵇ± 0/57
پروتئین	19/36ᵃ± 0/49	13/62ᵇ± 0/43
چربی	2/47ᵃ± 0/21	0/18ᵇ± 0/07
خاکستر	1/69ᵃ± 0/16	0/57ᵇ± 0/03
pH	-	7/1 ± 0/11

*حروف متفاوت در ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد $(p<0.05)$ (±SD).

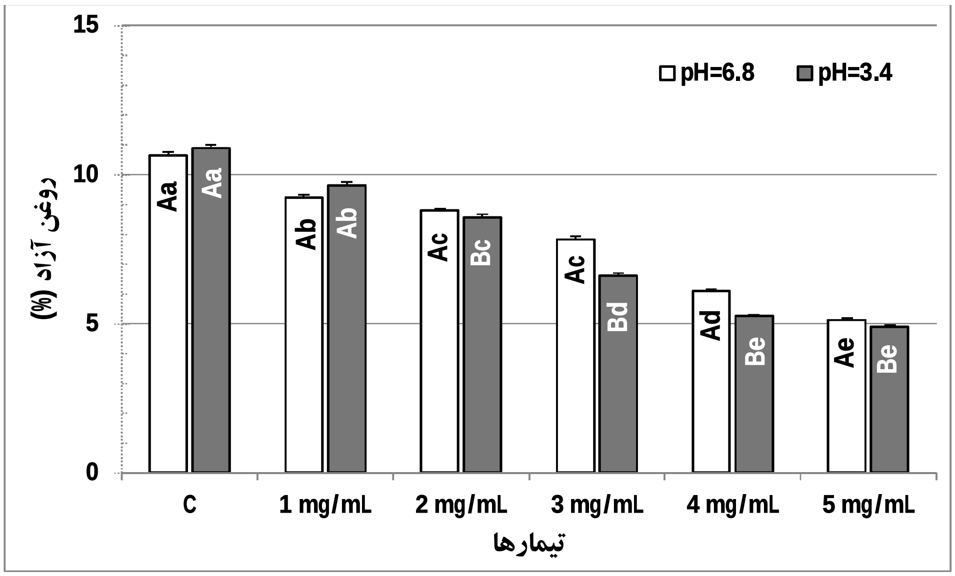


شکل 1- تصویر میکروسکوپ نوری میکروامولسیون‌های روغن کیلکا با ترکیبات مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده در های 6/8 (سمت راست) و 3/4 (سمت چپ)، پس از 24 ساعت نگهداری در دمای یخچال

تغییرات روغن آزاد و کارآیی ریزپوشانی

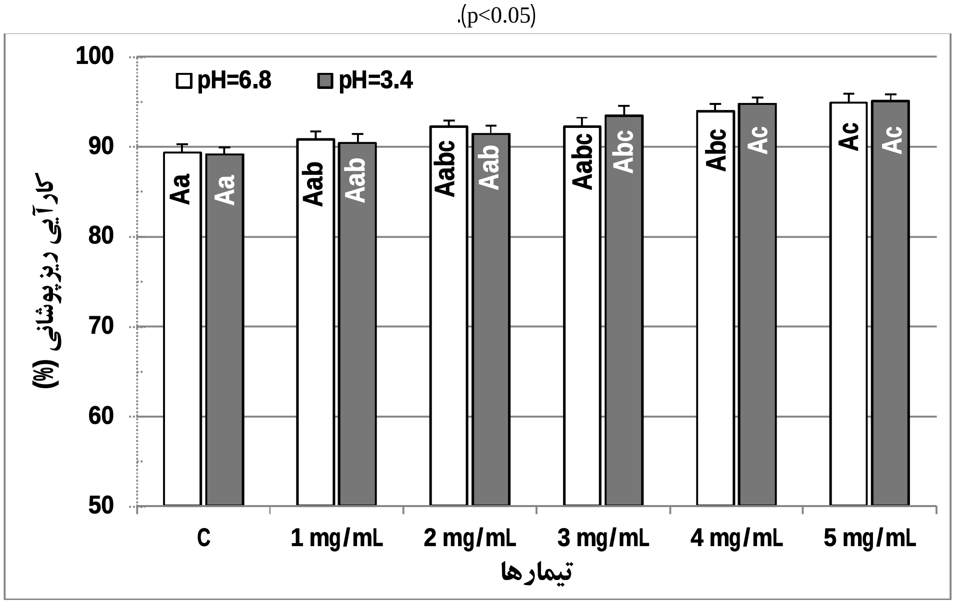
میزان روغن آزاد برای تیمار شاهد در pHهای 6/8 و 3/4 تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان نداد $(p>0.05)$. افزودن مقدار 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدرولیز، میزان روغن آزاد میکروامولسیون را در مقایسه با شاهد، به‌طور معنی‌داری کاهش داد و این عملکرد در pHهای مورد بررسی یکسان بود (شکل 2). اثرات pH در غلظت‌های هیدرولیز 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر، محسوس بود. بدین صورت که در غلظت‌های مساوی، میزان روغن آزاد در pH 3/4 بطور قابل ملاحظه‌ای، در مقایسه با pH 6/8، پائین‌تر بود $(p<0.05)$. در عین حال ارتباط مستقیم و معکوس بین غلظت هیدرولیز و میزان روغن آزاد مشاهده گردید. هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای با آلکالاز، موجب شکستن پیوندهای پپتیدی و رها شدن مجموعه‌ای از پپتیدهای با نسبت‌ها و توالی‌های اسید ×ه‌ای متنوع و اوزان مولکولی مختلف می‌گردد. نتایج نشان داد که در غیاب هیدرولیز، مقدار روغن آزاد نسبتاً قابل ملاحظه‌ای در سامانه میکروامولسیون روغن ماهی، باقی می‌ماند. افزودن هیدرولیز پروتئینی موجب افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی می‌شود و میزان روغن آزاد امولسیون‌نشده را کاهش می‌دهد. در عین حال با افزایش میزان هیدرولیز در لایه بینابینی آب و روغن در pH اسیدی نیز میزان روغن ریزپوشانی‌شده، متناسب با غلظت، افزایش می‌یابد. پروتئین‌های استخراج شده از سویا، آب‌پنیر، کازئین، ماهی و گوشت، ترکیبات دوقطبی (آمفیفیلیک) محسوب شده و می‌توانند در تسهیل تشکیل، بهبود پایداری و تولید ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب در امولسیون‌های O/W به‌عنوان امولسیفایر در مواد غذایی مورد استفاده قرارگیرند (Dickinson, 2006) . پوشش کامل قطرات روغن اغلب مستلزم به کارگیری غلظت بحرانی (C*) پروتئین در فاز آبی است. در غلظت پایین پروتئین (C*>C)، سطح روغن به‌طور کامل با پروتئین پوشیده نخواهد شد. پایداری مطلوب امولسیون مستلزم پوشش کامل سطوح بینابینی روغن- آب بدون باقی گذاشتن مقدار قابل ملاحظه

پروتئین جذب نشده است (C*=C) (Dickson, 1999). pH فاز آبی نیز بر عملکرد هیدرولیز و میزان روغن آزاد میکروامولسیون تأثیر داشت. پپتیدهای موجود در هیدرولیزهای پروتئینی، در pHهای مختلف دارای توزیع بار الکتریکی متفاوت می‌باشند که موجب تغییر در برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین خود و سایر مولکول‌ها شده و در نتیجه میزان فعالیت سطحی آن‌ها تغییر خواهد نمود (Zhu *et al.*, 2018). تحقیقات تکمیلی در زمینه درک مکانیسم دقیق برهم‌کنش‌های بین پروتئین‌ها و پپتیدها با سایر ترکیبات امولسیفایر و مواد دیواره‌ای نظیر مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده شیمیایی مورد نیاز می‌باشد.



شکل 2- میزان روغن آزاد تیمارهای مختلف روغن کیلکا ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده و تیمارهای 5-1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای در pHهای مختلف (SD+)

*حروف کوچک و بزرگ متفاوت درون ستون‌ها، به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف در یک pH و بین pHهای مختلف برای هر تیمار می‌باشند ($p<0.05$).



شکل 3- کارآیی ریزپوشانی تیمارهای مختلف روغن کیلکا ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح شده و تیمارهای 5 -1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای در pHهای مختلف (SD+)

*حروف کوچک و بزرگ متفاوت درون ستون‌ها، به‌ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف در یک pH و بین pHهای مختلف برای هر تیمار می‌باشند ($p<0.05$).

نتایج کارآیی ریزپوشانی تیمارهای مختلف روغن کیلکا با مواد دیواره‌ای و تیمارهای 1 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای در pH های مختلف در شکل 3 نشان داده شده است. در هیچیک از تیمارها اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین pHهای مورد بررسی مشاهده نگردید. استفاده از غلظت‌های 1 تا 3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هیدرولیز حاصل، اثر معنی‌داری بر کارآیی ریزپوشانی نسبت به تیمار شاهد نداشت. تیمار 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با بالاترین کارآیی ریزپوشانی، اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای شاهد و 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در pH 6/8، و تیمارهای 1 تا 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در pH 3/4 نشان داد ($p>0.05$). در مجموع روند تغییرات کارآیی ریزپوشانی، مشابه و متناسب با نتایج به‌دست آمده در خصوص میزان روغن آزاد می‌باشد.

اندازه قطرات میکروامولسیون

میانگین اندازه قطرات امولسیون (D_{32}) تیمارهای شاهد در pHهای 6/8 و 3/4، اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول 3). استفاده از غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدرولیز نیز اثر معنی‌داری بر میانگین اندازه قطرات در مقایسه با تیمار شاهد در هیچیک از pHها ایجاد ننمود. افزودن هیدرولیز به میزان 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر، موجب کاهش قابل ملاحظه اندازه قطرات در مقایسه با گروه شاهد گردید ($p<0.05$). تیمارهای دارای 3 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری را از حیث میانگین اندازه قطرات در pH 6/8 نشان ندادند. در pH 3/4 تیمار 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای کوچکترین میانگین اندازه قطرات بوده و تفاوت معنی‌داری را با تمامی تیمارهای با غلظت پائین‌تر نشان داد. یافته اخیر موافق با دیگر نتایج تحقیق بوده و بیان می‌دارد که افزودن میزان 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر، از پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای، موجب افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی و فشردگی بیشتر قطرات خواهد گردید. مشخص گردیده که ویژگی‌های امولسیون مانند پایداری، ویسکوزیته، اندازه قطرات و همچنین میزان روغن آزاد و پایداری اکسایشی، متأثر از نوع و ترکیب مواد دیواره‌ای مورد استفاده برای ریزپوشانی خواهند بود (Jafari *et al*., 2008). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ترکیب مالتودکسترین با برخی ترکیبات نظیر نشاسته اصلاح‌شده موجب ارتقای ظرفیت امولسیون‌کنندگی آن می‌گردد (Carneiro *et al*., 2012). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن پپتیدها علاوه بر نشاسته اصلاح‌شده، موجب بهبود خواص سطحی و افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی در سامانه امولسیون خواهد گردید.

جدول 3- میانگین اندازه قطرات و پایداری میکروامولسیون‌های تهیه شده با نسبت‌های مختلف پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای در pHهای 6/8 و 3/4 (میانگین± انحراف معیار)

شاخص / تیمار	pH	شاهد	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	4 mg/mL	5 mg/mL
(μm) D_{32}	6/8	$5/69^{Aa}\pm0/12$	$5/81^{Aa}\pm0/15$	$5/12^{Ab}\pm0/09$	$4/58^{Ac}\pm0/13$	$4/73^{Ac}\pm0/11$	$4/31^{Ac}\pm0/10$
	3/4	$5/88^{Aa}\pm0/13$	$5/79^{Aa}\pm0/17$	$5/02^{Ab}\pm0/16$	$4/69^{Ab}\pm0/15$	$4/85^{Ab}\pm0/11$	$4/08^{Ac}\pm0/12$
جدا شدن امولسیون (٪)	6/8	$4/8^{Aa}\pm0/27$	$3/9^{Aab}\pm0/31$	$3/2^{Abc}\pm0/19$	$3/1^{Abc}\pm0/26$	$2/6^{Ac}\pm0/17$	$1/8^{Ad}\pm0/12$
	3/4	$5/5^{Aa}\pm0/34$	$4/7^{Aa}\pm0/28$	$4/5^{Bab}\pm0/33$	$4/4^{Bab}\pm0/31$	$3/5^{Bbc}\pm0/21$	$3/0^{Bc}\pm0/18$

* حروف متفاوت بزرگ در ستون و کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری می‌باشند ($p<0.05$).

پایداری امولسیون

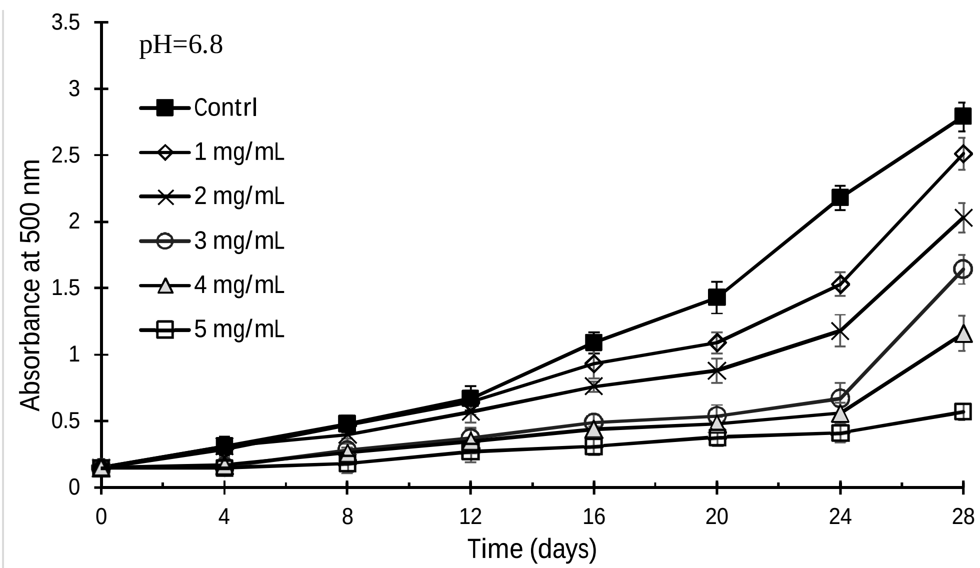
پایداری امولسیون در برابر دوفاز شدن و تشکیل خامه در pH 6/8 نسبت به pH 3/4 بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری را در غلظت‌های 2 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد (جدول 3). در pH 6/8 استفاده از غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش قابل ملاحظه پایداری امولسیون نسبت به تمامی تیمارهای مورد بررسی گردید و کمترین میزان جدا شدن امولسیون مشاهده شد. در pH 3/4 اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های 4 و 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از حیث پایداری امولسیون مشاهده نگردید. در عین حال تنها این تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار شاهد نشان دادند ($p<0.05$). ادعا شده است که اندازه کوچکتر ذرات امولسیون در شرایط یکسان همگن‌سازی می‌تواند موجب بهبود پایداری در برابر به‌هم‌پیوستن، به دلیل افزایش نیروهای دافعه و کاهش نیروهای جاذبه بین قطرات، و همچنین کاهش گرایش به جداشدن ثقلی و تشکیل خامه گردد (Zhu *et al*., 2018). نتایج تفاوت قابل ملاحظه بین اندازه قطرات امولسیون در تیمارهای 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دو pH به‌کار رفته را نشان نداد (جدول 3). بدین ترتیب به‌نظر می‌رسد که عامل تغییرات بار الکتریکی ناشی از تفاوت pH بر پایداری امولسیون در برابر دوفاز شدن مؤثر واقع گردیده است. pH ایزوالکتریک اغلب پپتیدها بین 4/5 تا 5/5 بوده و بدین ترتیب افزایش pH از 3/4 به 6/8، موجب تغییر بار الکتریکی خالص پپتیدها از مثبت به منفی خواهد گردید. (Taherian *et al*., 2011). میزان بارالکتریکی پپتیدها به درجه یونیزاسیون گروه‌های آمین ($-NH2$) و کربوکسیل

(-COOH) و در ارتباط مستقیم با pH فاز آبی احاطه کننده خواهد بود (Surh *et al*., 2006). در حوالی pH ایزوالکتریک، تعداد گروه‌های با بار مثبت و منفی برابر گردیده و برآیند بار الکتریکی مولکول صفر یا خنثی می‌شود. افزایش pH پس از این نقطه موجب القای بار الکتریکی منفی و افزایش تعداد گروه‌های آنیونیک و کاهش گروه‌های کاتیونیک خواهد شد (Taherian *et al*., 2011). بار منفی پپتیدهای قرار گرفته در سطح بینابینی در pH 6/8 در این تحقیق، می‌تواند موجب تشدید برهم کنش‌های بین پپتید- روغن ماهی- مواد دیواره‌ای و در نتیجه پایداری بیشتر امولسیون گردد.

پایداری اکسایشی میکروامولسیون روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده

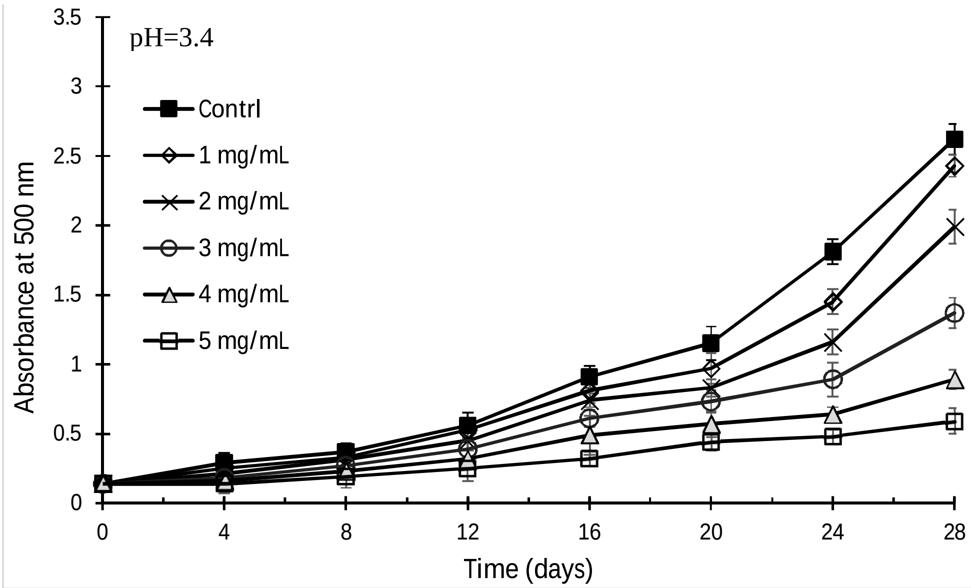
توانایی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای در جلوگیری یا به تأخیر انداختن اکسیداسیون اولیه لیپیدها، در سامانه مدل میکروامولسیون روغن کیلکا، در دو pH اسیدی و خنثی مورد ارزیابی قرار گرفته است (شکل 4 و 5). نتایج نشان داد گروه شاهد در pHهای مورد بررسی، دارای بالاترین میزان جذب بود که بیانگر بیشترین میزان اکسایش در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری طی 28 روز، می‌باشد. بدین‌ترتیب به‌رغم نوسانات قابل مشاهده، پپتیدهای موجود در هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای توانستند به‌طور موثری سرعت اکسایش روغن کیلکای ریزپوشانی‌شده در سامانه مدل را کند نمایند.

روند توسعه اکسیداسیون وابسته به غلظت پپتید و برای تیمار شاهد و تیمارهای 1 تا 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت غیرخطی بود. بدین صورت که ابتدا افزایش پراکسید با شیب ملایم و سپس با شتاب تندتری صورت گرفت و این روند با افزایش غلظت پپتید کندتر شد. این شتابگیری برای تیمار شاهد از روز 12 و برای سایر تیمارها، متناسب با غلظت، در زمان طولانی‌تر بود. البته روند این افزایش برای شاهد از روز 20 و برای اغلب تیمارها از روز 24، با شتاب بیشتری اتفاق افتاد (شکل 4 و 5). طی 12 روز اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین تیمار شاهد با تیمارهای 2 و 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نگردید ($p>0.05$). تغییرات اکسایشی مشابه، در سامانه مدل اسید لینولئیک (دمای 40 درجه سلسیوس، pH خنثی) تنها طی مدت 3 روز در تیمار شاهد توسط Cai و همکاران (2015) و Chi و همکاران (2015) گزارش شده است. با وجود استعداد اکسایش‌پذیری بسیار بالای اسیدهای چرب زنجیره بلند چندغیراشباع موجود در روغن کیلکا (جدول 1) در دمای 45 درجه سلسیوس، بالاتر بودن پایداری اکسایشی تیمار شاهد در این تحقیق را می‌توان به ریزپوشانی مناسب و نقش محافظت‌کنندگی فیزیکی مواد دیواره‌ای نسبت داد. در روغن بذرکتان ریزپوشانی‌شده با مخلوط مالتودکسترین و نشاسته اصلاح شده، میزان پراکسید پس از 2 هفته و محصولات ثانویه اکسایش در فضای بسته‌بندی[5] (پروپانال و هگزانال) پس از 3 هفته نگهداری در دمای 45 درجه سلسیوس افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داده است (Carneiro *et al*., 2012).



شکل 4- پایداری اکسایشی روغن کیلکای ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده در حضور غلظت‌های مختلف هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای طی 4 هفته نگهداری در دمای $45^{\circ C}$ و pH 6/8 (±SD).

5 Head space



شکل 5- پایداری اکسایشی روغن کیلکای ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح‌شده در حضور غلظت‌های مختلف هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای طی 4 هفته نگهداری در دمای $45^{\circ C}$ و pH 3/4 (±SD).

روند افزایش میزان جذب برای تیمار 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طی 28 روز به‌صورت خطی و با شیب ملایم بوقوع پیوسته است. این روند برای pHهای 3/4 و 6/8 مشابه بود (شکل 4 و 5). فرایند اکسیداسیون اولیه روغن بسیار پیچیده و مستلزم تشکیل و انتشار رادیکال‌های لیپیدی و هیدروپراکسیدها در حضور اکسیژن می‌باشد. فعالیت قوی ممانعت‌کنندگی اکسیداسیون اولیه هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای در سامانه میکروامولسیون ریزپوشانی‌شده روغن کیلکا، بیانگر این واقعیت است که پپتیدهای موجود قادر بودند تا با رادیکال‌های تشکیل شده، شامل رادیکال پراُکسیل، واکنش داده و در نتیجه از چرخه انتشار اکسیداسیون اولیه جلوگیری به عمل آورند. پپتیدها و هیدرولیزهای پروتئینی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی از خود بروز می‌دهند که بستگی به اندازه پپتیدها، توالی اسیدهای آمینه و حضور اسیدهای آمینه خاص دارد (Li *et al*., 2017). برخی اسیدهای آمینه آبگریز، نظیر هیستیدین به دلیل دارا بودن حلقه ایمیدازول، می‌توانند با دادن هیدروژن، رادیکال‌ها را مهار و در برابر اکسیداسیون لیپیدها فعال باشند (Chi *et al*., 2015). امولسیون حاوی مقادیر 500 تا 1000 قسمت در میلیون هیدرولیز ژلاتین پوست کوسه نوک باله سیاه (*C. limbatus*) با استفاده از آنزیم شیره پاپایا، قادر بوده است تا به‌طور موثری اکسایش اولیه اسید لینولئیک را به تأخیر اندازد (Kittiphattanabawon *et al*., 2012).

مقایسه نتایج حاصل از پایداری اکسایشی (شکل 4 و 5) و سایر نتایج این تحقیق (شکل 2، 3 و جدول 3)، تایید کننده این نظریه است که به‌رغم اثرات هیدرولیز حاصل بر برخی ویژگی‌های ساختاری میکروامولسیون روغن کیلکا، نظیر میزان روغن آزاد، کارآیی ریزپوشانی، اندازه قطرات و پایداری امولسیون، فعالیت محافظت‌کنندگی مشاهده شده ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای موجود در هیدرولیز و مستقل از pH می‌باشد. سرعت اکسایش روغن آزاد در مقایسه با روغن ریزپوشانی‌شده، حتی در حضور هیدرولیزهای پروتئینی به‌مراتب بیشتر خواهد بود. روند تغییرات اکسیداسیون اولیه در سامانه امولسیون بدون ریزپوشانی، برای اسید لینولئیک (Dong *et al*., 2008، Cai *et al*., Tao *et al*., 2018 and 2015) و روغن کبد ماهی کاد (Ghelichi *et al*., 2017) بررسی شده و عمده تغییرات اکسایشی برای تیمارها، طی حداکثر 7 روز گزارش گردید. در تحقیق حاضر نیز در صورت اکسایش اولیه قابل ملاحظه روغن آزاد، انتظار می‌رفت که تغییرات میزان جذب در 2 تا 3 روز نخست مشاهده گردد. در خصوص اثر تغییرات میانگین اندازه قطرات بر پایداری اکسایشی تیمارهای مختلف نیز نتایج نشان‌دهنده این واقعیت است که این دو پدیده مستقل از یکدیگر اتفاق افتاده‌اند. غلظت‌های 3 تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدرولیز در pH 6/8 و 2 تا 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در pH 3/4 اثر معنی‌داری بر میانگین اندازه قطرات امولسیون‌ها نداشته‌اند (جدول 3) در حالیکه اثرات این غلظت‌ها بر پایداری اکسایشی قابل ملاحظه بوده است. ادعا شده است که ترکیب سطح‌بینابینی بسیار مهم‌تر از مساحت کلی سطح می‌باشد (Dursch *et al*., 2008). بدین ترتیب اختلافات مربوط به پایداری اکسایشی تیمارهای با غلظت‌های مختلف هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای را نمی‌توان در ارتباط با تفاوت در میانگین اندازه قطرات دانست.

نتیجه‌گیری

هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای با آلکالاز، تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواص امولسیون‌کنندگی و آنتی‌اکسیدانی می‌نماید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز حاصل، در سامانه میکروامولسیون، وابسته به غلظت می‌باشد و pHهای 3/4 و 6/8 اثر معنی‌داری بر آن ندارد. همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی در ارتباط با تغییرات خصوصیات ساختاری و فیزیکی میکروامولسیون نبوده، از این‌رو می‌توان آنرا به عملکرد پپتیدهای تشکیل‌دهنده نسبت داد. افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان به روغن کیلکای یزپوشانی شده با مالتودکسترین و نشاسته اصلاح شده شیمیایی، موجب افزایش قابل ملاحظه پایداری اکسایشی محصول خواهد گردید. پتانسیل استفاده از هیدرولیز آلکالازی پوست کپور نقره‌ای به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در تولید روغن ماهی ریزپوشانی‌شده، برای غنی‌سازی انواع مواد غذایی با دامنه گسترده pH، وجود دارد.

تشکر و قدردانی

دکتر علیرضا صادقیان و مهندس زینب زعفرانی در موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی مشهد جهت تهیه و ارزیابی میکروامولسیون‌ها، دکتر سمانه پژوهان مهر در تخلیص روغن خام ماهی کیلکا، مهندسین فرشته خدابنده، فاطمه نوغانی، معصومه رهنما و صغری کمالی در مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان (بندرانزلی) برای آماده‌سازی و تیمار پوست و بسیاری از مراحل اجرایی تحقیق، همکاری صمیمانه و بی دریغی داشته‌اند که بدین‌وسیله از همگی تقدیر به‌عمل می‌آید.

منابع

پژوهان مهر، س. (1395). سینتیک اکسایش روغن ماهی کیلکا در حضور فراکسیون‌های فعال آنتی‌اکسیدانی روغن‌های مغز و پوست بنه. پایان نامه دکتری علوم و صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی: 48-49.

سازمان شیلات ایران (1397). میزان پرورش ماهیان گرمابی. تاریخ مراجعه 1397/7/12. [*http://fisheries.ir/report_viwe.aspx?rep=parvaresh%20mahi%20garm*]

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P. & Gómez-Guillén, M.C., 2011, Antioxidant activity of several marine skin gelatins. LWT - *Food Science and Technology*, 44, 407-413.

AOAC, 2000, Association of Official Analytical Chemists. 17th Edition, *Official Method of Analysis*, Washington D.C., USA.

Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S. & Li, J., 2015, Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*, 16, 234–242.

Carneiro, C.F.G., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., & Hubinger, M.D., 2012, Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443-451.

Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V. & Dinesh Kumar, B., 2015, Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5817–5825.

Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R. & Zhang, B., 2014, Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19, 11211-11230.

Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, Z.R. & Luo, H.Y., 2015, Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Maine Drugs*, 13, 2580-2601.

Dickinson, E., 2006, Structure formation in casein-based gels, foams and emulsions. Colloids and Surfaces A: *Physicochemical and Engineering Aspects*, 288, 3–11.

Dickinson, E., 1999, Caseins in emulsions: Interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, 9: 305–312.

Dong, S., Zeng, M, Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. & Yang, H., 2008, Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107, 1485–1493.

Doucet, D., Otter, D.E., Gauthier, S.F. & Allen Foegeding, E., 2003, Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6300-6308.

Dursch, S., Benedetti, S., Scampicchio, M. and Mannino, S., 2008, Stabilization of Omega-3 fatty acids by microencapsulation. *Supplement to Agro FOOD industry*, 19(4), 31-32.

Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A. & Saari, N., 2015, Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory and anti-Oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *International Journal of Molecular Science*, 16, 28870–28885.

Ghelichi, S., Sørensen, A.M., García-Moreno, P.J., Hajfathalian, M., Jacobsen, C., 2017, Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions fortified with enzymatic hydrolysates from Common carp (*Cyprinus carpio*) Roe. *Food Chemistry*, 237: 1048-1057.

Global Organization for EPA and DHA Omega-3s (GOED). About EPA and DHA. http://www.goedomega3.com/about-epa-and-dha, March 19, 2018.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López -Caballero, M.E. & Montero, M.P., 2011, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative resources: A review. *Food Hydrocolloid*, 25, 1813-1827.

Gómez-Guillén M.C., López-Caballero M.E., Alemán A., López de Lacey, A., Giménez, B. & Montero, P., 2010, Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin; In: Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application, Section 7, 89-115, Estelle Le Bihan (Edit.). Transworld Research Network, Kerala, India.

Jacobsen, C., Let M.B.; Nielsen, N.S. & Meyer, A.S., 2008, Antioxidant strategies for preventing oxidative flavor deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 76-93.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008, Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26 (7), 816–835.

Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O. & Rawdkuen, S., 2017, Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: bioactivity and stability. *Food Chemistry*, 215, 383-390.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F., 2012, Gelatin Hydrolysate from Blacktip Shark Skin Prepared Using Papaya Latex Enzyme, Antioxidant Activity and Its Potential in Model Systems. *Food Chemistry*, 135(3), 1118–1126.

Klaypradit, W. & Huang, Y.W., 2008, Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. LWT, 41, 1133-1139.

Kolanowski, W. & Laufenberg, G., 2006, Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition (Review). *European Food Research Technology*, 222, 472-477.

Koocheki, A., Kadkhodaee, R., Mortazavi, S. A., Shahidi, F. & Taherian, A. R. 2009, Influence of Alyssum homolocarpum seed gum on the stability and flow properties of O/W emulsion prepared by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23, 2416-2424.

Li, X.R., Chi, C.F., Li, L. & Wang, B., 2017, Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. *Marine Drugs*, 15(61), 16 pp.

Mendis, E., Rajapakse, N. & Kim, S.K., 2005, Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 581-587.

Surh, J.; Decker, E. A. and McClements, D. J., 2006, Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, 20, 596–606.

Taherian, A.R., Britten, M., Sabik, H., & Fustier. P., 2011, Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 25: 868-878.

Tao, J., Zhao, Y.Q., Chi, C.F. and Wang, B., 2018, Bioactive peptides from cartilage protein hydrolysate of Spotless Smoothhound and their antioxidant activity in vitro. *Marine Drugs*, 16, 18 pp.

Valencia, P., Pinto, M. & Almonacid, S., 2014, Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by alcalase. Process Biochemistry, 49(2), 258-264.

Yi, J., Gobba, C.D., Skibsted, L.H. & Otte, J., 2017, Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1129–1144.

Zhang, L., Zheng, Y., Cheng, X., Meng, M., Luoa, Y. & Li, B., 2017, the anti-photoaging effect of antioxidant collagen peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin is preferable to tea polyphenols and casein peptides. *Food and Function*, 8, 1698-1707.

Zhang, Y., Duan, X. & Zhuang, Y., 2012, Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38, 13-21.

Zhong, S., Ma, C., Lin, Y.C. & Luo, Y., 2011, Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin Resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 126, 1636–1642.

Zhu, Z., Zhao, C., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Decker, E.A. & McClements, D.J., 2018, Impact of interfacial composition on lipid and protein cooxidation in oil-in-water emulsions containing mixed emulsifiers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Downloaded from http://pubs.acs.org on May 15, 2018. 41 pp.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 103- 115

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1399 ص. 115-103

The effects of alcalase prepared silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin hydrolysate on some quality features and oxidative stability of microencapsulated Kilka fish oil

S. H. Jalili[1], R. Farhoosh[2*], A. Koocheki[2], A. A. Motallebi[3]

Received: 2018.05.29
Accepted: 2019.01.15

Introduction: Considerable amounts of essential fatty acids in fish oil makes it possible to use in the production of functional foods to meet nutritional needs and beneficial effects on health. One of the major problems is their high susceptibility to oxidative deterioration and consequent production of undesirable flavor. At present, some synthetic compounds are used as antioxidants in food and biological systems, but the use of synthetic antioxidants is of concern due to their potential health hazards. Therefore, the use of natural antioxidants in foods is the first choice. Enzymatic protein hydrolysis has been applied to food industry by-products to produce foods with enhanced functional properties. Antioxidant and antiradical activity of protein hydrolysates from meat, skin, bone, viscera and roes of various aquatic species has been reported. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin (SCS), as low price by-product from minced products processing plants is available in I.R. Iran. Amino acids composition and sequencing determines the functional properties of peptides, which depends on the source of protein, the method and conditions of preparation and molecular weight distribution of resulting hydrolysate. The enzyme type and hydrolysis conditions, including enzyme/substrate ratio, temperature, time and pH, can affect the peptides length and functional properties of protein hydrolysates. The effects of hydrolysate from SCS hydrolyzed by alcalase on some quality features and oxidative stability of microencapsulated Kilka (*Clupeonella spp.*) oil at pH 6.8 and 3.4 were investigated.

Materials and methods: SCS was pre-treated with NaOH and acetic acid, washed and freeze dried. Proteolysis with alcalase (1% w/w) at 50 ºC, without pH adjustment, was performed for 4 hours with gentle stirring. Enzyme inactivated by placing the sample in a boiling water bath for 15 minutes. After centrifugation at 13000 g for 20 minutes, supernatant was removed as silver carp skin hydrolysate (SCSH) and freez dried. Emulsions were prepared with 31.25% dry material. 25% of wall materials (equal proportions of maltodextrin and Hi-Cap®100), fish oil 25% and SCSH (for preparing 1, 2, 3, 4 and 5 mg/mL treatments) in two adjusted pH 3.4 and 6.8, was used. Fish oil was refined using multi-layered column chromatography (alumina-silica gel), and fatty acid composition was determined. The emulsion pre-homogenized by the IKA Ultra-turrax at 15,000 rpm for 2 minutes and finally by a HSTO homogenizer at 350 bar for 5 circle, to produce microemulsion. Effects of treatments on the characteristics and oxidative stability of microencapsulated Kilka oil for 28 days in the dark at 45 ºC were compared by determination of surface oil, microencapsulation efficiency, free oil, emulsion stability (%separation), droplet size, optical microscopic observation of morphology and peroxidation stability.

Results & discussion: Results showed significant differences between proximate composition of silver carp skin, before and after pre-treatment and revealed that applied method and conditions reduced the amounts of oil and ash to an acceptable level. No aggregation and cluster formation was observed in optical microscopic images of prepared emulsions. The effects of pH on the droplet size and microencapsulation efficiency were insignificant ($p > 0.05$), but the amount of free oil and emulsion stability were significant at ≥2 mg/mL concentrations of hydrolysate ($p<0.05$). Peptides effectively retarded the preoxidation of Kilka oil in the model system. Hydrolysate antioxidant power was dose dependent. Peroxidation trends were nonlinear for control and 1-4 mg/mL treatments. These trends continued linearly, with mild slope for 5 mg/mL, and was similar for 2 pH during 28 days. Hydrolysate of SCS may be used as a natural antioxidant for the production of stable microencapsulated fish oil for the enrichment of various kinds of beverages with a wide range of pH.

Key words: Kilka fish oil, Silver carp skin hydrolysate, Alcalase, Microencapsulation, Oxidative stability.

1 and 2. Ph.D. of Food Science and Technology, and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
3. Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
(*- Corresponding Author Email: rfarhoosh@um.ac.ir)